

# Reconocimiento por Hibridación In situ de RNAm de Vasopresina en Hipotálamo de ratas bajo condiciones de Hiperosmolaridad plasmática

Luis Alberto Cerquera E., MD., Lic. Bio-Qca, Msc. Fisiología  
Docente Dpto. Fisiología (USCO)

Felipe García M., Biólogo, PhD. Biología Molecular (UNIVALLE).

## RESUMEN

La ingesta de soluciones salinas hipertónicas (2% y 4% p/v de NaCl) durante nueve días produce incremento progresivo altamente significativo de la osmolaridad plasmática (OsmP), con descenso en el día sexto y gran incremento en el día noveno. El análisis de los balances líquidos (BL) sugiere, que los animales que ingieren ss 2% tienden hacia un modelo de volumen extracelular (VEC) aumentados; y los que ingieren ss 4% la tendencia es hacia un modelo de volumen extracelular reducido. Se valoró el modelo de hiperosmolaridad plasmática, con base en los efectos de las variables independientes OsmP y VEC, sobre: - La liberación de vasopresina de la hipófisis al

plasma (según trabajos de referencia), - y sobre niveles de RNAm de vasopresina del sistema neurosecretorio magnocelular hipotálmico (mediante la técnica neuro histoquímica de Hibridación in situ, HI). Se concluyó:

1. Los incrementos de la osmolaridad plasmática y reducción del VEC, tienden a aumentar liberación de vasopresina de neurohipofisis al plasma, y viceversa (verney, E. 1947; Hatton, 1988; Lightman, 1990).
2. Los estímulos más potentes que inducen aumentos en los niveles de RNAm de vasopresina, están en el grupo de ss4%. Allí, la OsmP incre-

• El presente resumen hace parte de los primeros resultados de investigación obtenidos en el Desarrollo o Implementación de la Neurociencias en la Universidad Surcolombiana, Facultad de Ciencias de la Salud, Neiva, Huila, Colombia. La publicación SERIE INVESTIGACIONES No. 2, del Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico -CIDECA-, próxima a editarse, publicará en detalle los avances conseguidos en este proyecto.

mentada y el VEC reducido, se potencian para liberar la vasopresina de la neurohiposis al plasma (Verney 1947; Hatton, 1988). Estas deplecciones de depósitos de vasopresina, postulamos es el estímulo que el induce el gran incremento en la transcripción de RNAm de vasopresina que detectamos nosotros en el presente trabajo.

3. La ingesta incrementada de ss 2%, inhiben la liberación de vasopresina en el plasma (Lightman, s. 1990), ocasionada creemos por el aumento del VEC. Esta escasa reducción de depósitos de vasopresina en la neurohipofisis, postulamos es la responsable de que hayamos encontrado una moderada transcripción de los niveles de RNAm de la vasopresina en este grupo.
4. La técnica neurohistoquímica de HI, es altamente sensible y específica; y una excelente herramienta de Biología molecular para las valoraciones de modelos neurofuncionales.

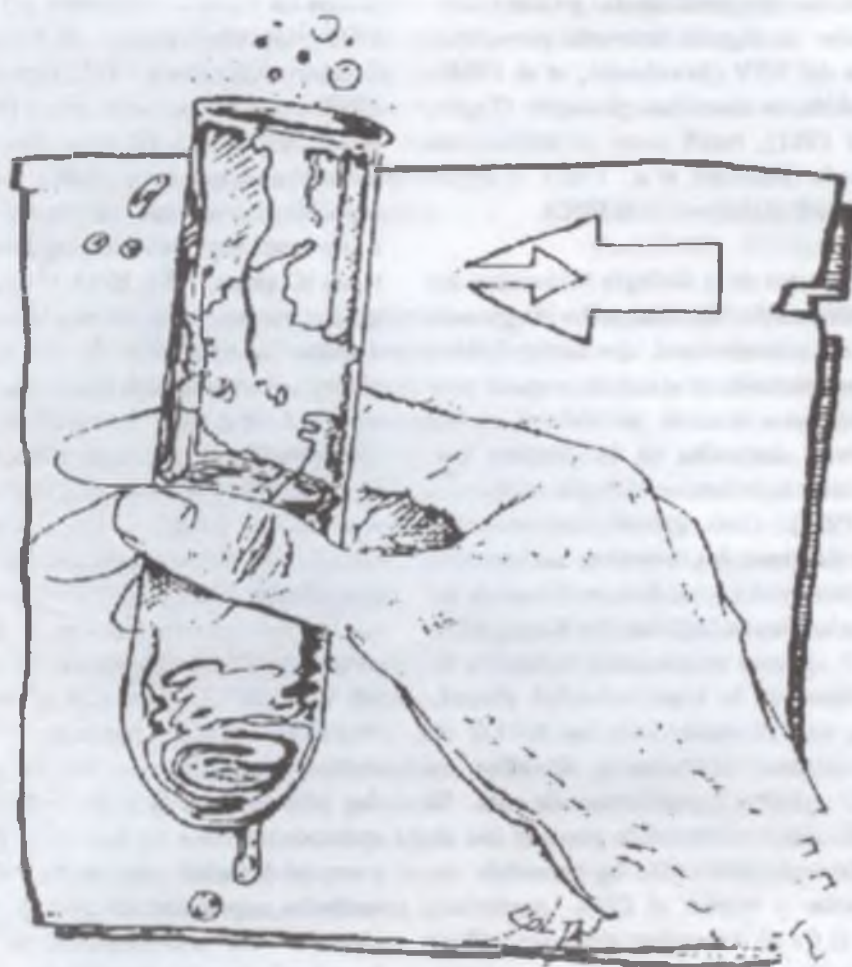
### INTRODUCCION

**Contexto Histórico:** Nos satisface poder presentar estos resultados que vemos como preliminares, a la comunidad científica colombiana y Latinoamericana, realizados con metodologías consideradas en investigaciones en punta por los reportes de la literatura, científica mundial. Es mucho aún el camino por recorrer para el perfeccionamiento y adquisición de la infraestructura investigativa que nos permita consolidar

resultados. Creemos haber conseguido capacidad técnica y humana en la realización de este tipo de trabajo. Esto nos permitirá abordar con un grupo multidisciplinario ya consolidado en las Universidades Surcolombiana y del Valle, proyectos que implementen y desarrollen estas metodologías para estudio de las neurociencias, en la última década de los 500 años del descubrimiento de América, considerada como la década para el estudio del cerebro por el mundo científico.

**Citoarquitectura y neurotransmisores.** El estudio citoarquitectónicos del hipo-tálamo comprende un grupo neuronal bien definido conocido como sistema neurosecretorio magnocelular, conformado por el núcleo supraóptico (NSO) y el paraventricular (NPV), cuyos axones terminan en la neurohiposis entre otros sitios, y otros grupos neuronal cuyas terminales nerviosas se localizan a nivel de la eminencia media y cuyos productos neurosecretorios son transportados por la circulación portal a la adenohipofisis, conocidas como sistema neurosecretorio parvocelular (Silverman, Pichard 1983). Las primeras observaciones de calidad neurosecretora en vertebrados e invertebrados, fueron realizadas por Sharrer, E. 1928; Scharrer, E. 1944.

Estos trabajos dieron oportunidad de sugerir el papel de los productos neurosecretorios en el control del desarrollo físico y mental, reproductivo y de funciones metabólicas. Lo anterior con base en la relación morfofuncional bien reconocida entre el hipotálamo y los sistemas límbico, endocrino y nervioso autónomo. La oxi-



tocina y la vasopresina fueron los primeros péptidos hipotálamicos y de hecho los primeros cerebrales en ser aislados y caracterizados por Du Vigneaud y colegas (Pierce, y Du Vigneaud, 1956); otros estudios bioquímicos posteriores denotaron que estos péptidos están siempre presentes con sus respectivas neurofisinas, (neurofisina tipo I con oxitocina y tipo II con vasopresina)

(Dean, C., Hope, D. y Hazic, t. 1968; Dean, y Hope, D. 1988).

Se han identificado otros péptidos en los núcleos supraópticos y en paraventriculares, como: encefalina en rata, dinorfina acompañando vasopresina en el mismo animal (Watson, et al 1982), factor liberador de corticotrofina (FLC) localizado con oxitocina en un tercio de las



neuronas magnocélulares y con vasopresina en algunas neuronas parvocélulares del NPV (Sawchenko, et al 1984). También se describen glucagon (Tager, et al 1981), /cck8 como se había mencionado (Beinfeld, et al. 1980), y angiotensina II (Kilcayne, et al 1980).

**Aportes de la Biología Molecular:** En las últimas dos décadas, se ha progresado en el conocimiento de neuropéptidos como resultado de el uso de mejores procedimientos técnicos, particularmente los métodos derivados de la genética molecular y de la inmunobiología (Scharer, B. 1987). Con estas técnicas se busca correlacionar los aspectos moleculares con los fisiológicos. Este es el caso de las experiencias de Lightman, S y Young III en 1987, quienes relacionan la condición fisiológica de la hipersolaridad plasmática, con incremento de los RNAm de vasopresina, oxitocina y dinorfina en NSO y NPV hipotálamico de rata. El análisis de los bancos de genes el uso de enzimas de restricción ha permitido secuenciar y mapear el DNA genómico, con el fin de determinar sitios específicos de un locus que representan un péptido determinado.

La base del concepto genérico "hibridación entre ácidos nucleicos", radica en el hecho de que dos cadenas sencillas de DNA o de RNA complementarias pueden acoplarse mediante la formación de puentes de hidrógeno entre sus bases complementarias y generar hélices dobles de DNA-DNA o RNA-DNA. Las formas de hibridación in situ (HI) (GALL y Pardue, 1969; John, et al 1969); la hibri-

dación en colonia (Grunstein y Hogness 1975), las hibridaciones de Northern y Southern (Southern 1975; Bittner, et al 1980) y la hibridación en punto (Kafatos, et al., 1979). La HI., es una técnica histoquímica que hace posible reconocer específicamente una secuencia de un ácido nucleico dado en secciones de tejido (Coghlan, 1984; Bloch 1985). De los grupos que han utilizado esta técnica para detectar la expresión de RNAm asociados a neuropéptidos (entre otros; Morris, B. J., et al 1988; Young III, W.S., et al 1986; Buckkey, M.J., et al. 1988; Uhl, G. R., et al 1988; Wisden, W., et al. 1990), aquellos que han usado valoraciones funcionales de sistema neurosecretor magnocelular del NSO y NPV de hipotálamo, son los más referenciados en la instauración de la técnica (Lightman, S. y Young III, W.S 1987; Lightman, S. y Young III, W., 1988). La razón por la que se usa este sistema hipotálamico radica en que son dos núcleos muy bien definidos citoarquitectónicamente en tamaño y función, como se describió anteriormente, caracterizados especialmente por la producción de dos neuropéptidos de acción hormonal como son la oxitocina y la vasopresina.

**Genes y poliproteínas:** A través de los análisis de la estructura genética y de las pruebas inmunobiológicas, se ha revelado que muchos péptidos bioactivos como la vasopresina entre otros, son sintetizados como parte de proteínas gigante precursoras de alto peso molecular, las que son liberadas por cortes proteolíticos específicos. Las preprosofisininas son ejemplo de ello, ya que cada una de ellas contiene

vasopresina u oxitocina, neurofisiina específica y un glicopeptido, (Martin, R. Voight, K. 1981; Watson, et al 1982; Holt, et al 1981).

Algunos de los péptidos indicados pueden actuar como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nervioso: tal es el caso de los opioides como las encefalinas y las betaendorfina y como hormonas en la circulación: es el caso de los nonapéptidos vasopresina y oxitocina, también denominadas hormonas neurohipofisarias.

Los genes que codifican las proteínas precursoras de las hormonas oxitocinas y vasopresina con neurofisinas asociadas, se han aislado y secuenciado de la genoteca de rata por Ivell y Richter en 1984. Se trata de genes pequeños de unos 850 pares de bases, que transcriben RNAm de unas 500 bases (sin el poly A), de organización exon-intron similar, con tres zonas exónicas (A= en cuyo interior están las secuencias de vasopresina y oxitocina para cada gen; B= representan las secuencias de las neurofisinas respectivas; C= representa las secuencias de los glipopéptidos para cada gen), y dos zonas intrónicas intercaladas en medio de los tres exones.

Utilidad y modelo histofuncional: De las mayores utilidades aportadas por toda esta tecnología, consiste en aprovechar las secuencias que se conocen de nucleótidos que codifican por un péptido particular, con el fin de sintetizar artificialmente una secuencia complementaria y antiparalela a la conocida, utilizando

máquinas diseñadas especialmente para este fin. La secuencia creada se marca con radiosótopos, enzimas, o compuestos fluorescentes, para rastrear o sondear la secuencia complementaria y antiparalela de RNA o DNA en los tejidos (hibridación in situ, HI). Un excelente modelo histofuncional, para mostrar la confiabilidad estadística de la técnica de HI, está en el sistema neurosecretorio magnocelular del NSO yNPV del hipotálamo.

Las respuestas de este sistema a cambios funcionales tales como el incremento de la osmolaridad plasmática, la lactación stress, dolor y anestésicos, incrementan liberación de vasopresina, mientras que el etanol y la hipoosmolaridad la deprimen, demostrado por estudios electrofisiológicos y por determinación de los niveles hormonales (Brimble y Dyball, 1977; Lightman and Everitt, 1986 Robinson, 1986).

La función de vasopresina radica en la propiedad que tiene de aumentar permeabilidad al agua de la membrana de los túbulos colectores y túbulos contorneados del riñón. Como resultado se facilita la recuperación del agua filtrada, reduciéndose el volumen urinario y conservando el agua corporal (Mountcastle, 1980. Medical Physiology).

La vasopresina perisférica ayuda a mantener la presión de perfusión arterial y el volumen intravascular. Los estímulos más efectivos para secreción de vasopresina es un incremento en concentración de solutos extracelulares; una pequeña elevación del 2% osmolaridad

plasmática causa un incremento de dos a tres veces en los niveles de hormona perisférica (Sladek, 1985). Aunque menos potente, otros indicadores de depleción del volumen extracelular estimulan también liberación de vasopresina, incluyendo pérdida del volumen plasmático, disminución de presión sanguínea y la hipoxia o hipercapnia perisférica o ambas (Hatton, 1990; Bisset, 1988). En contraste, la ingesta líquida, aún cuando ellos sean hipertónicos, resulta en una caída brusca en los niveles de vasopresina sistémica, probablemente debido a estimulación de osmoreceptores en orofaringe (Lightman, S. 1990).

La vasopresina circulante mantiene el balance del volumen extracelular ac-

tuando tanto a nivel renal, donde estimula retención de agua y aumenta la excreción de iones sodio y cloruros, como a nivel de las arteriolas, donde es uno de los más potentes vasoconstrictores hasta ahora identificados (Wakerley, 1987; Lightman, 1990). La coliberación de vasopresina y oxitocina del sistema neurosecretorio magnocelular en respuesta a estímulos perisféricos, incluyen la elevación de la osmolaridad plasmática y el estrés (Renaud y Bourque 1990; Populain y Wakerley 1982). Balment y cols demostraron que la oxitocina circulante incrementa intensamente el efecto natriurético de la vasopresina en el riñón (Balment, et al 1986).